

肺移植後虚血・再灌流肺障害における抗酸化ストレス転写因子Nrf2の役割の検討

著者	東郷 威男
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3780号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124192

氏 名	とうごう たけお 東郷 威男
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	肺移植後虚血・再灌流肺障害における 酸化ストレス転写因子 Nrf2 の役割の検討
論 文 審 査 委 員	主査 教授 岡田 克典 教授 仁尾 正記 教授 香取 幸夫

論 文 内 容 要 旨

背景：肺移植は終末期呼吸器疾患に対する有効な治療法として確立しているが、いまだに術後急性期死亡率が高く改善の余地を残している。急性期死因のうち最も多いのが虚血・再灌流障害に基づく移植肺機能不全である。虚血・再灌流肺障害は、低酸素、再酸素化や冷却、再加温により、種々の炎症性サイトカイン、好中球エラスターゼ、活性酸素種が大量に産生され発症するとされている。とりわけ活性酸素種の大量産生は本病態の主因と考えられてきたが、現行の肺移植診療における肺障害予防策の中に直接的に活性酸素種を制御するものは使用されていない。Nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は酸化-抗酸化バランス調節の中心的役割を果たす転写因子である。酸化ストレスや炎症などの刺激に即応し Nrf2 target gene とよばれる抗酸化、解毒代謝遺伝子群を広範にかつ強力に誘導して細胞保護作用を発揮する。本研究では移植後虚血・再灌流肺障害において Nrf2 が保護的な役割を果たすとの仮説のもと、ラット同系左片肺移植モデルを用いて Nrf2 欠損 (Nrf2 KO) の影響と Nrf2 活性化剤の効果について検討した。

方法と結果：はじめに、Fischer ラット同系左片肺移植モデルにおいて、灌流冷保存 6 時間後、移植 2 時間後と 24 時間後の肺組織中酸化ストレス、Nrf2 活性化、アポトーシス、Nrf2 target gene および proinflammatory cytokine gene 発現の変化を検討した。野生型 (WT) ラット肺では、灌流後 6 時間の冷保存によって肺胞壁における Nrf2 核染色陽性細胞割合の増加、Nrf2 target gene である NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) と glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) の発現亢進が招来された。肺胞壁における 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 核染色陽性細胞割合も増加傾向で、酸化ストレス蓄積により Nrf2 が活性化された可能性が示唆される。左肺移植 2 時間後には、グラフト肺組織中で NQO1、GCLM に加え heme oxygenase-1 (HO-1) も control 肺に比し発現亢進した。移植 24 時間後には、肺胞壁における 8-OHdG 核染色陽性細胞割合が増加し、Nrf2 核染色陽性細胞割合は冷保存後同様高値のまま維持されているにも関わらず、NQO1 および GCLM

遺伝子発現は control レベルに復し、HO-1 遺伝子発現も移植 2 時間後に比し低値となった。移植肺組織中 proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6]、interleukin-18 [IL-18]、tumor necrosis factor α [TNF α]) 遺伝子発現は、移植 2 時間後をピークに著明に亢進し、移植 24 時間後には肺胞壁の TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 陽性アポトーシス細胞割合が増加していた。

次に、*Nrf2* KO ラットをドナーとして左片肺移植した群 (KO 群) と WT ラットをドナーとした群 (WT 群) と比較した。KO 群では WT 群に比し、移植 2 時間後の移植肺コンプライアンスは有意に不良となり、PaO₂/FiO₂ ratio (P/F ratio)、alveolar-arterial oxygen gradient (AaDO₂) も不良となる傾向があった。移植 24 時間後には、WT 群におけるグラフト肺 wet to dry weight ratio (W/D)、肺コンプライアンス、P/F ratio、AaDO₂ は改善傾向を示すものの、KO 群では改善が遅れる傾向があり、W/D、肺コンプライアンス、P/F ratio、AaDO₂ はいずれも WT 群に比し KO 群で有意に不良であった。肺移植 2 時間後のグラフト肺の病理組織学的所見 (肺胞壁肥厚、出血、肺水腫、好中球浸潤、perivascular cuffing) は *Nrf2* KO により明らかな影響を受けなかったが、移植 24 時間後までのそれらの回復は WT 群に比し KO 群で遅れ、肺水腫および好中球浸潤は、WT 群に比し KO 群で有意にその程度が強いことが確認された。*Nrf2* KO は、肺移植 24 時間後の肺組織 *Nrf2* target gene NQO1 発現を有意に低下させ、肺移植 2 時間後の proinflammatory cytokine IL-6、IL-18、TNF α 遺伝子と 24 時間後の TNF α 遺伝子発現を有意に亢進させ、肺胞壁アポトーシス細胞割合を増加させたが、酸化ストレス蓄積には影響を及ぼさなかった。

最後に、*Nrf2* 活性化剤 oltipraz の左片肺移植後虚血・再灌流肺障害に対する効果を検討した。レシピエントラットへの oltipraz 前投与 (500 mg/kg 胃内投与) は、肺移植 24 時間後のグラフト肺組織中 *Nrf2* target gene NQO1、GCLM、HO-1 の有意な発現亢進を招来させ、肺胞壁酸化ストレス蓄積を軽減させる傾向を示し、アポトーシス細胞割合を減少させた。W/D、病理組織学的所見には明らかな効果を及ぼさなかったが、移植 24 時間後の P/F ratio、AaDO₂ を有意に改善させ、肺コンプライアンスを改善させる傾向を示した。

結論：*Nrf2* は、ラット左片肺移植モデルにおける術後急性期の虚血・再灌流肺障害の重症度を著明に軽減させる作用を持たないが、proinflammatory cytokine IL-6、IL-18、TNF α 遺伝子発現亢進を抑制し、肺胞壁構成細胞のアポトーシスを軽減させ、肺障害からの回復を促すことが明らかとなった。*Nrf2* 活性化剤 oltipraz のレシピエントラットに対する前投与は、移植 24 時間後のグラフト肺組織中の *Nrf2* target gene NQO1、GCLM、HO-1 発現を亢進させ、肺胞壁構成細胞のアポトーシスを抑制し、虚血・再灌流肺障害による低肺酸素化能からの回復を促進する効果を有する。

審査結果の要旨

博士論文題目 肺移植後 虚血・再灌流肺障害における抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 の役割の検討

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 呼吸器外科学分野

学籍番号 B4MD5107 氏名 東郷 威男

肺移植は終末期呼吸器疾患に対する有効な治療法として確立しているが、いまだに術後急性期死亡率が高く改善の余地を残している。急性期死因のうち最も多いのが虚血再灌流障害に基づく移植肺機能不全である。虚血再灌流障害は、種々の炎症性サイトカイン、好中球エラスターゼ、活性酸素種が大量に産生され発症するとされ、とりわけ活性酸素種は本病態の主因と考えられてきた。しかし、現行の肺移植において直接的に活性酸素種を制御するものは使用されていない。Nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は酸化・抗酸化バランス調節の中心的役割を果たす転写因子であり、酸化ストレスや炎症などの刺激に即応し Nrf2 target gene とよばれる抗酸化、解毒代謝遺伝子群を広範にかつ強力に誘導し細胞保護作用を発揮する。本研究は、移植後虚血再灌流障害における Nrf2 の役割についてラット同系左片肺移植モデルを用いて検討したものである。研究の結果から、まず、灌流冷保存されたグラフト肺で Nrf2 が活性化していること、移植したグラフト肺においては酸化ストレス蓄積と Nrf2 の活性化がみられるにも関わらず、アポトーシスする肺胞細胞が増加していることが示されている。次いで、ドナーに Nrf2 KO (欠損) ラットを用いてグラフト肺における Nrf2 欠損の影響を検討し、野生型 (Wild Type) 群と比べ Nrf2 KO 群において肺機能および組織学的な経時的改善が遅延することから、Nrf2 は 肺移植後虚血再灌流肺障害の重症度を軽減させないが、肺障害からの回復を促す可能性が示されている。その機序に関して Nrf2 は proinflammatory cytokine gene の発現亢進と肺胞壁細胞のアポトーシスを抑制することが示され、Nrf2 target gene の発現とともに検討されている。また、Nrf2 活性化剤 oltipraz をレシピエントラットへ移植前投与を行ったところ、グラフト肺組織中の Nrf2 target gene の発現を亢進させ酸化ストレス蓄積を軽減する傾向を示し、アポトーシスする肺胞細胞を減少させることが示されている。これまで Nrf2 は酸化ストレスや炎症が一要因と考えられる様々な病態に対して抑制的に作用することが明らかとなっており、他臓器における虚血再灌流障害においても保護効果が得られているが、肺移植虚血再灌流障害モデルにおいて検討し、Nrf2 の保護効果を示したのは本研究が初めてである。Nrf2 活性化剤 oltipraz の肺移植後虚血再灌流障害に対する効果は期待したほど顕著ではなかったが、今後の展望として肺保存液への添加など Nrf2 活性化剤の使用法について検証することでより有効な肺移植後虚血再灌流障害の予防策となり得る可能性が示唆され、極めて新規性に富む優れた研究であると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。